

Выявление антимуtagenных и антиканцерогенных свойств у «курунговитов Кутушова» микроядерным тестом на эритроцитах *Brachydanio rerio*

Введение

Данное испытание по выявлению антимуtagenных и антиканцерогенных свойств у сухого кисломолочного продукта «Курунговиты Кутушова» № 29 проведено с использованием аквариумной рыбки *Brachydanio rerio* путем проведения микроядерного теста. За последние годы лабораторные аквариумные рыбы *Brachydanio rerio* стали незаменимым объектом для исследования канцерогенных и антиканцерогенных соединений [1,2] и наиболее выгодны в экономическом отношении, так как стоимость одной рыбки во много раз дешевле крысы или мыши, но которых ранее проводились исследования в области цитогенетики и онкологии. В то же время, у данио есть множество генов сходных с генами человека и других млекопитающих, среди которых ген-супрессор p53, ответственный за элиминацию из организма переродившихся раковых клеток [3].

Для выявления антимуtagenных и антиканцерогенных свойств у «курунговита Кутушова», нами предложено микроядерное тестирование на эритроцитах рыб. Это один из наиболее эффективных методов, позволяющий выявить, как действие токсиканта на генетические изменения у конкретных особей [4], так и возможное защитное действие курунговитов Кутушова.

В качестве генотоксичного вещества нами взят бихромат калия (стандартный токсикант применяемый в водной токсикологии), обладающий одновременно мутагенными и канцерогенными свойствами [5].

Не смотря на то, что мы исследуем периферическую кровь при проведении микроядерного теста, по микроядрам можно судить о воздействии на эритроциты во время их созревания. Изучая морфологию и цитохимию микроядер можно выявить, защищает ли курунговит Кутушова наследственный аппарат от воздействия генотоксичного вещества и определить сохраняется ли в клетках во время эритропоэза ген p53, или же он выходит из строя, и тогда клетка может переродиться в злокачественную. Имеются данные, что элиминация поврежденного генетического материала может идти и без митоза, при этом морфогенез микроядер отличается от образования микроядер при разрыве ДНК и образовании фрагментов хромосом в процессе митоза [6]. Подобное может наблюдаться при сохранении во время мутагенеза гена p53 под влиянием препарата защищающего данный ген.

Цель данного исследования - выявление наличия антимуtagenных и антиканцерогенных свойств у курунговитов Кутушова на эритроцитах *Brachydanio rerio* микроядерным тестом.

Материал и методы исследования

Испытание наличия антимуtagenных и антиканцерогенных свойств у «Курунговита Кутушова» проведено микроядерным тестом на эритроцитах молоди рыб *Brachydanio rerio*. Рыбы в возрасте 2 месяца, длиной 2 см, помещались в пластиковые аквариумы по 5 штук в отстойную водопроводную воду. Объем воды в каждом аквариуме составлял 3 литра. В общей сложности было поставлено 10 аквариумов с данио. Кормление рыб осуществлялось французским кормом «Скрежен» с размером гранул 200 -300 микрон. Рыб перед опытом в течение недели адаптировали к новым условиям, а затем в воду опытных аквариумов добавляли растворы бихромата калия, и начали осуществляться кормление рыб с курунговитом Кутушова.

Схема постановки опыта приведена на рис. 1.



Рис. 1. Схема постановки аквариумов с *Brachydanio rerio* при испытании «Курунговитов Кутушова» с прописью, компонентов вносимых в каждый аквариум (аквариумы обозначены прямоугольниками).

Как видно из схемы постановки опыта эксперименты проведены с двойной повторностью. Данио раскрошенные таблетки курунговитов Кутушова без корма не съедают (берут в рот, а через некоторое время выплевывают). Поэтому гранулы курунговитов впрессовывались в гранулы корма в фарфоровой ступке пестиком, это позволяет делать наличие рыбьего

жира в корме. После этого появилась возможность давать расчетные дозы препарата рыбам. По прописи для человека в сутки на килограмм веса рекомендовано принимать 0,1 таблетки Курунговита. Из этого делается расчет, соотношения корма и курунговита,. Рыбы съедают за сутки примерно 1/5 часть корма от своего веса. Для примера рыба массой в 1кг, съест 200 г корма, и с этими 200 г мы должны дать за сутки 0,1 таблетки курунговита. Однако, учитывая потери препарата с кормом в аквариуме, и повышенную токсикорезистентность рыб к лекарственным препаратам по сравнению с человеком, мы можем увеличить дозу курунговита в корме в 10 раз. Следовательно, в 200 г корма следует ввести 1 таблетку курунговитов, а в 100 г 0,5 таблетки курунговита. Именно в такой пропорции мы и готовили корм с курунговитом для молоди *Brachydanio rerio*. Кормление 5 рыб в каждом аквариуме (масса одной особи была примерно 300 мг) осуществляли два раза в сутки, за один раз рыбам давалось по 150 мг корма, либо без курунговита, либо с курунговитом, согласно выше приведенной схеме на рис. 1.

Продолжительность опыта составила 15 дней, в течение которых в периферической крови набирались эритроциты с микроядрами. Через 15 дней готовились препараты живой крови рыб, и производился учет микроядер в эритроцитах с применением люминисцентной микроскопии.

Для каждого анализа отбиралась кровь у пяти рыб. Кровь бралась путем отрезания хвостового стебля, что давало возможность получить небольшую каплю крови на предметном стекле, на которую затем помещался раствор акридинового оранжевого и покровное стекло, через 5 минут, время действия красителя, препарат считается готовым к исследованию. Таким образом, не делался мазок крови, а получался препарат давленная капля, который широко используется в микроскопии при исследовании живых клеток. Прижизненное изучение крови проводилось использованием люминисцентной микроскопии, что позволяло выявлять ядра эритроцитов и лейкоцитов, а также микроядра в эритроцитах.

Для прижизненного выявления ядерного материала в форменных элементах крови, содержащего ДНК, мы применили люминисцентный краситель, акридиновый оранжевый. Окраску свежей капли крови рыб проводили по общепринятой методике [7] (по Барталанффи и Биккинсу) 0,1 % раствором акридинового оранжевого, разведенного 9-ю частями забуференного раствора Кребса-Рингера.

На препарате, одновременно с морфологическими особенностями ядер эритроцитов, выявлялись места локализации нуклеиновых кислот. Ядра (ДНК) флуоресцируют зеленым цветом, а РНК красным, микроядра, в которых изменилась структура ДНК, светятся темнокрасным цветом.

Проведение люминисцентного анализа крови рыб с использованием акридинового оранжевого, которым выявляется ДНК в ядрах и микроядрах эритроцитов рыб, позволяет исключить артефакты, любые другие частицы, близкие по размерам к микроядрам. Тем самым нами сделан более точный

микроядерный тест, по сравнению с тестом, включающим фиксацию и использование общепринятых красителей крови для световой микроскопии.

Для люминисцентного цитохимического анализа форменных элементов крови рыб мы использовали микроскоп УХ-1.

Согласно общепринятым методическим указаниям по проведению микроядерного теста [4] в контроле и для каждого варианта опыта обсчитывают 2000 эритроцитов, в которых учитывают количество микроядер в ‰. и проводилась статистическая обработка результатов по критерию Сьюдента.

Результаты испытаний

Исследование крови *контрольных* рыб позволяет выявить ядра эритроцитов и микроядра в тех клетках, где генетический материал подвергся спонтанному мутированию под влиянием внешних и эндогенных факторов.. Картина крови контрольных рыб представлена на рис. 2.

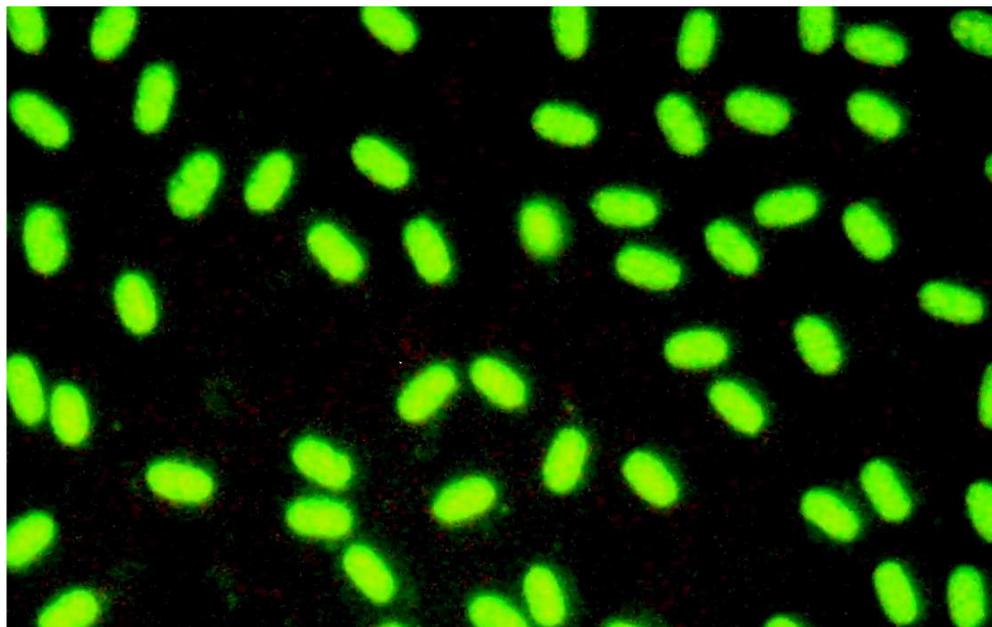


Рис.2. Картина живой крови контрольных рыб. Вид в люминисцентный микроскоп (краситель акридиновый оранжевый) (ув. 40 x 15). Видны ядра эритроцитов (ДНК окрашивается в зеленый цвет) В некоторых случаях встречаются эритроциты с микроядрами (внизу).

Долю клеток с микроядрами определяли по отношению к общему количеству проанализированных эритроцитов. У контрольных рыб было проанализировано 2000 эритроцитов на препаратах полученных от 10 особей.

В результате проведения микроядерного анализа выявлено, что частота встречаемости эритроцитов с микроядрами у контрольных особей составляет **1,13 ‰**.

При исследовании крови рыб, находящихся в растворах бихромата калия с концентрацией 0,5 мг/л выявлено, что количество микроядер в эритроцитах значительно возрастает. При этом микроядра флуоресцируют не зеленым цветом, а темнокрасным, что указывает на изменение структуры ДНК и на инактивацию генетического материала под влиянием генотоксиканта. Картина крови *Brachydanio rerio* после двухнедельного пребывания в растворах генотоксиканта представлена на рис. 3.

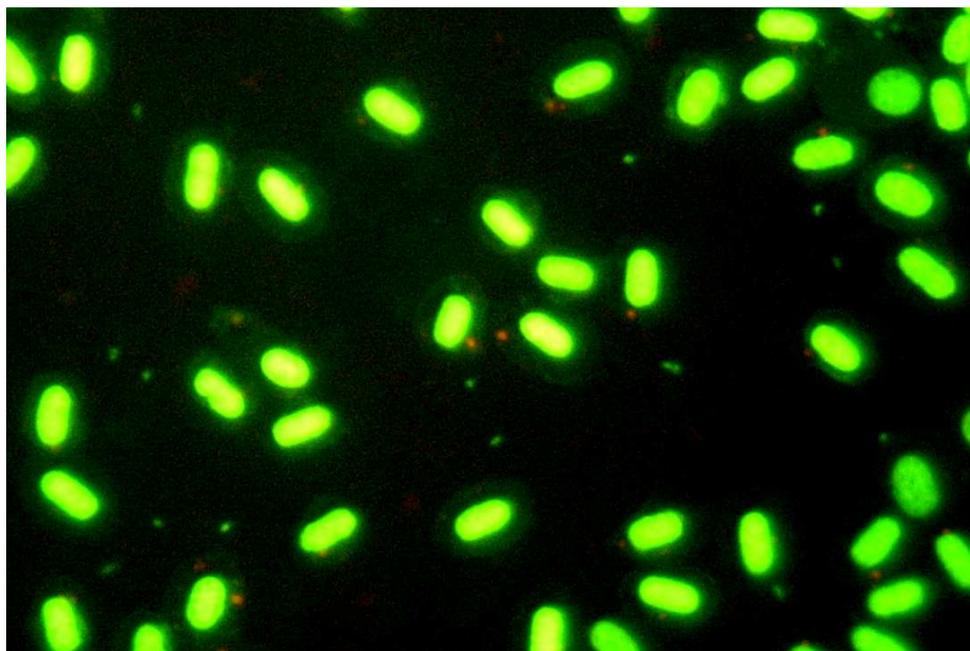


Рис. 3. Картина крови данио после 15 дневного пребывания в растворах бихромата калия с концентрацией 0,5 мг/л. Ядра эритроцитов светятся зеленым цветом, а микроядра красным.

Микроядерный тест на рыбах, находящихся в растворах бихромата калия с концентрацией 0,5 мг/л, при обследовании 2000 клеток красной крови, позволил выявить, что частота встречаемости эритроцитов с микроядрами составляет **5,85 %**. Этот показатель более чем в 5 раз превышает частоту встречаемости микроядер в эритроцитах контрольных рыб, и указывает на высокую генотоксичность бихромата калия в исследуемой концентрации. Красное свечение микроядер признак того, что ДНК в них в них разрушена. Видимо, генотоксичное действие шестивалентного хрома, проявляется и в ядрах эритроцитов, где пораженные участки ДНК начинают светиться красным цветом, и все ядро приобретает желтоватый оттенок.

Рыбы, находящиеся в растворах бихромата калия с концентрацией 0.5 мг/л, и получающие с кормом расчетную дозу курунговитов Кутушова, были более подвижны, что можно отнести к детоксицирующему действию исследуемого продукта. Проведение микроядерного теста на эритроцитах этих рыб как бы подтверждает это наблюдение. Картина крови *Brachydanio*

regio, находящихся в растворах генотоксиканта и получавших с кормом курунговиты Кутушова, представлена на рис. 4.

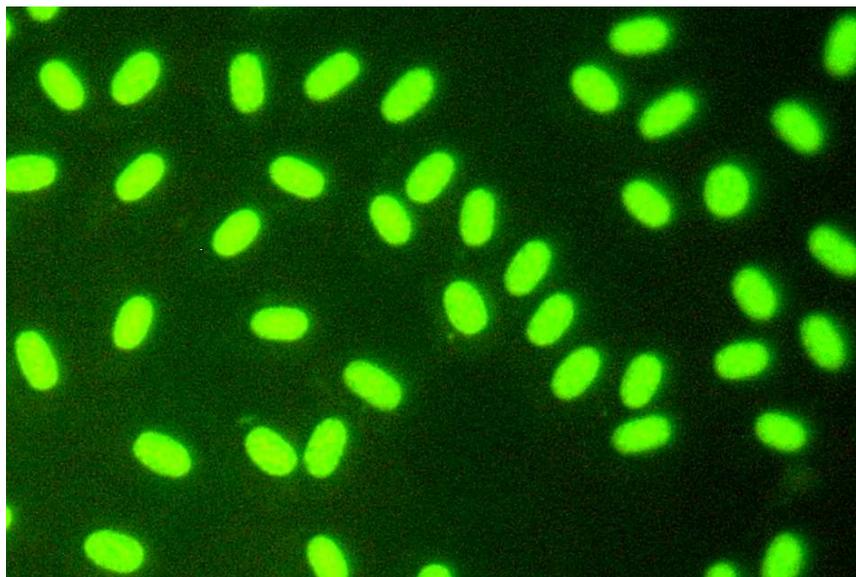


Рис. 4. Вид крови *Brachydanio rerio* после 15-и дневного пребывания в растворе бихромата калия (0,5 мг/л) и получавшей с кормом «Курунговиты Кутушова». Микроядра в эритроцитах светятся зеленым цветом, как и ядра. Встречаются протуберанцы (слева над ядром эритроцита размытое свечение).

Исследование эритроцитов таких рыб показывает, что частота встречаемости микроядер в эритроцитах резко падает по сравнению с той частотой, которая отмечалась в красных клетках крови рыб, находящихся в той же концентрации генотоксиканта, но не получавших с кормом курунговиты. Частота встречаемости микроядер в эритроцитах периферической крови у рыб, потреблявших курунговиты, составила **2,32 %**.

Второй особенностью было то, что микроядра флуоресцировали зеленым цветом, как и ядро эритроцита. То есть генетический материал микроядер был близок по структуре к ДНК, находящейся в ядре. Желтоватых оттенков в окраске ядра, которые указывали бы на деструкцию ДНК, не наблюдается. Отмечается только зеленоватое свечение. Помимо микроядер около ядер эритроцитов можно заметить протуберанцы хроматина, к которым, скорее всего, представляют выброс из ядра дефектного хроматина. Частота встречаемости протуберанцев в этом варианте опыта составляет **1,58 %**. Можно считать, что «Курунговиты Кутушова» проявляют себя как антимутагены не только на хромосомном, но и на генном уровне. А в этом случае защитные свойства курунговитов от шестивалентного хрома распространяются также на антираковый ген p53. Следовательно, «Курунговиты Кутушова» обладают как антимутагенными, так и антиканцерогенными свойствами.

В аквариумах, где вода содержала бихромат калия в концентрации 1.0 мг/л, все рыбы выжили в течение 15 дней. Картина живой крови этих рыб в поле зрения люминисцентного микроскопа представлена на рис. 5.

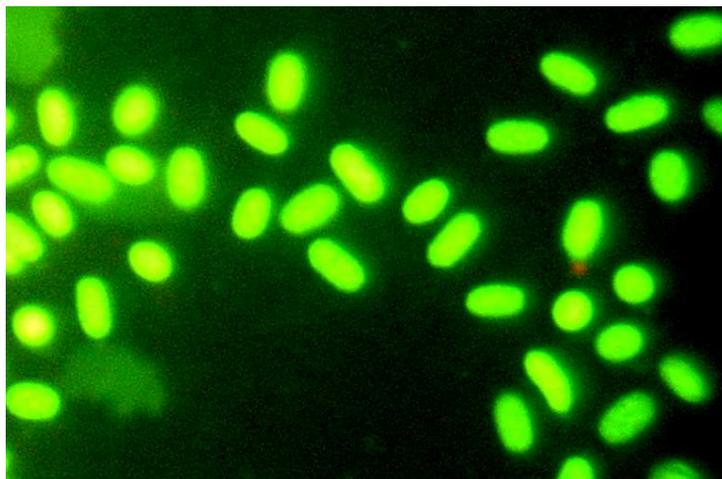


Рис. 5. Картина крови *Brachydanio rerio* после 15 дней экспозиции в растворах бихромата калия с концентрацией 1,0 мг/л. Микроядра красного цвета, ядра зеленые. (Одно из микроядер красного цвета видно внизу ядра с правой стороны рисунка)

Анализ микропрепаратов живой крови данио, окрашенной акридиновым оранжевым, показывает, что для ядер эритроцитов характерен полиморфизм (один из признаков токсического воздействия). Ряд эритроцитов имеет желтоватую окраску, указывающую на молекулярные изменения в структуре ДНК. В эритроцитах можно обнаружить микроядра красного цвета, указывающие на инактивацию в них генетического материала.

В 2000 проанализированных эритроцитах частота встречаемости микроядер оказалась равной **2,83 %**. Это значительно ниже, чем при действии бихромата калия с концентрацией 0,5 мг/л. Объяснить падение микроядерного индекса при концентрации шестивалентного хрома 1,0 мг/л, можно только одним, снижением количества митозов в почечной ткани, где происходят процессы эритропоэза, под действием токсиканта. Скорее всего, мутации при данной концентрации бихромата калия чаще происходят на геномном уровне, чем хромосомные мутации, которые выявляются по образованию микроядер, потому что их наблюдается очень мало.

В связи с этим, что концентрация бихромата калия 1,0 мг/л вызывает больше точечных мутаций, вероятность поражения гена p53 возрастает. Мутации гена p53, приводят к тому, что клетки, имеющие признаки злокачественности, не элиминируются, а вещество, вызывающее их перерождение, выступает как канцероген.

Последний вариант испытания по выявлению антимутагенных и антиканцерогенных свойств у «курунговитов Кутушова» проводился в

аквариумах с водой содержащей бихромат калия в концентрации 1,0 мг/л, а рыбы при этом с кормом получали установленные дозы курунговитов. Микроскопическая картина крови рыб через 15 дней после начала испытания приведена на рис. 6.

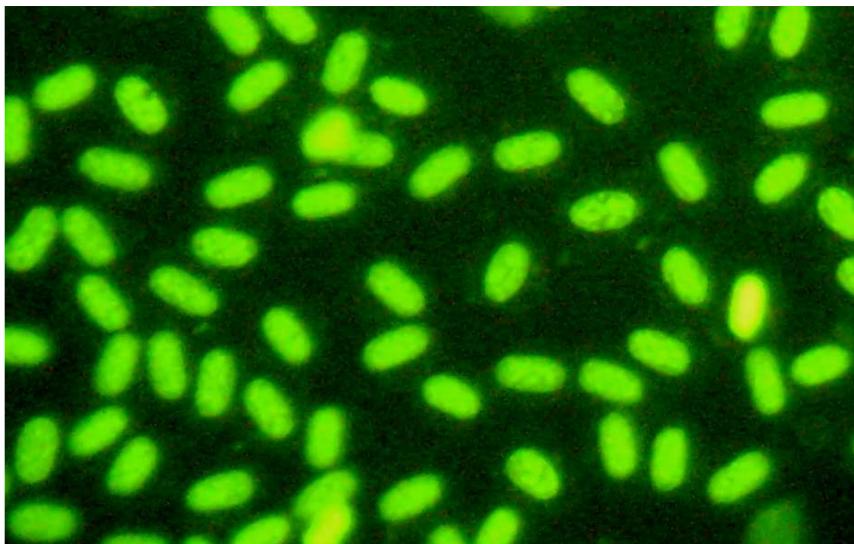


Рис. 6. Картина крови данео после 15-ти дневного пребывания в растворе бихромата калия (1.0 мг/л) и получения курунговитов с кормом. Выброс генетически дефектного хроматина.

На препарате, представленном на рис. 6. видно, что при воздействии вещества, содержащего шестивалентный хром и одновременном приеме с кормом «Курунговитов Кутушова» происходит выброс хроматина из ядер, напоминающий протуберанцы. Образуется плохо выраженное микроядро, за которым тянется след до ядра. Скорее всего, из ядра без митоза выбрасывается дефектный хроматин. Одновременно наблюдается элиминация эритроцитов с пораженными ядрами (на препарате видны 3 желтых ядра эритроцитов). Можно предположить, что под антимуtagenным влиянием курунговитов в клетках во время эритропоэза сохраняется ген p53, который способствует элиминации наследственного материала, несущего множественные мутации.

Положительным воздействием курунговитов в этом случае можно считать исчезновение полиморфизма ядер и присутствие в них (кроме инактивированных и пожелтевших) зеленой флуоресценции, указывающей на сохранение структуры ДНК.

Подсчет эритроцитов с выбросами из ядер хроматина показал, что частота встречаемости их высокая и составляет **5,1 %**. Однако микроядра в этом случае не ярко выражены, скорее напоминают тени, часто за ними тянется шлейф до ядра, и мы их обозначили, как протуберанцы. Частота встречаемости обычных микроядер была близка к контролю (1,06 %).

На основании проведенных исследований построена диаграмма частоты встречаемости микроядер в эритроцитах *Brachydanio rerio* в различных вариантах опыта (рис.7).

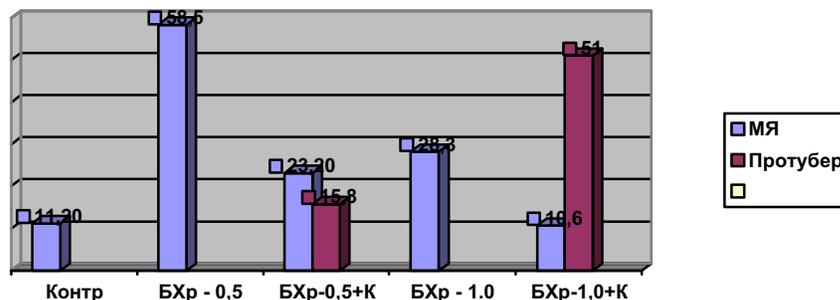


Рис.7. Частота встречаемости микроядер в эритроцитах данио в различных вариантах опыта (результаты вверху столбца даны в %).

Условные обозначения: БХр- бихромат калия
К –Курунговиты Кутушова

Анализ данных, приведенных на диаграмме (рис.7), показывает, что микроядерный тест (МЯТ) на эритроцитах *Brachydanio rerio* лучше всего проводить при концентрации бихромата калия - 0,5 мг/л. При концентрации бихромата калия 1 мг/л проявляется более выраженная токсичность Cr^{+6} и, видимо, ингибируются митозы во время эритропоэза. Хотя исследование действия этой концентрации позволяет выявить некоторые антимуtagenные и антиканцерогенные свойства «Курунговитов Кутушова», применять ее для скрининга антимутагенов нами не рекомендуется.

Таким образом, в результате испытаний по выявлению у «Курунговитов Кутушова» антимуtagenных и антиканцерогенных свойств с применением микроядерного теста на живых эритроцитах молоди *Brachydanio rerio*, появляется возможность дать ответ, что такими свойствами исследуемый продукт обладает.

Заключение

Испытание «Курунговитов Кутушова» проведено на тест-объекте, получившем всеобщее признание у цитогенетиков, на молоди аквариумной рыбки - *Brachydanio rerio*. Рыбы. 50 особей, длиной 2см, содержалась 15 дней в растворах бихромата калия, обладающего мутагенными и канцерогенными свойствами, при концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л. (Всего 10 аквариумов) Часть рыб получала гранулированный корм с «Курунговитами Кутушева», другая часть без курунговитов. Дозировка курунговитов в сутки - 0,1 таблетки на 10 г живого веса рыб. По окончании опыта готовили микропрепараты крови и проводили микроядерный тест на живых эритроцитах рыб, с окраской их акридиновым оранжевым и исследованием на люминисцентном микроскопе.

В результате испытаний выявлено, что бихромат калия в концентрации 0,5 мг/л приводит к возрастанию частоты встречаемости микроядер в эритроцитах более чем в 5 раз (5,85%) по сравнению с контролем (1,13 %). Окраска ДНК в пораженных ядрах и микроядрах - красная, что говорит об изменении структуры ДНК. Тогда как у рыб, получавших с кормом «Курунговиты Кутушова», микроядра в эритроцитах встречаются только с частотой 2,32%. При этом окраска ДНК в ядрах и микроядрах зеленая, что указывает на защитное действие курунговитов от генотоксиканта по отношению к ДНК а, следовательно, и к антираковому гену p53.

В растворах бихромата калия (1,0 мг/л) все рыбы выжили. Однако проводить микроядерный тест на эритроцитах при этой концентрации не рекомендуется, так как при токсическом воздействии Cr^{+6} подавляется митотическая активность и частота встречаемости микроядер падает до 1 %.

Таким образом, продукт «Курунговиты Кутушова» обладает антимуtagenными и антиканцерогенными свойствами, выявляемыми по частоте образованию микроядер в эритроцитах рыб и по цитохимии ДНК.

Литература

1. Traver D, Winterer A, et al., Effects of lethal irradiation in zebrafish and rescue by hematopoietic cell transplantation// *Blood* **1**. 2004. **04**, pp. 1298–1305.
2. Niethammer Ph., Clemens A et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish// *Cell Death Differ.* 2009 **1**: 431-442.
3. Oren M. Decision making by p53://*Life, death and cancer.* №3 -2003.
4. Симаков Ю.Г. Учет частоты образования микроядер в эритроцитах рыб// Методические указания по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов (ПДК и ОБУВ) для воды водных объектов . имеющих рыбо.хозяйственное значение. М.: ВНИРО. 1998 - с.100.
5. Изтлеуов М.К. Патогенез нарушений гомеостаза, вызванных избыточным поступлением хрома в организм, и пути их коррекции. Диссертация на соискание ученой степени Д.М.Н.2004. 356 с.
6. ИльинскихН.Н., ИльгинскихИ.Н., Некрасов В.Н. .Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность// *Цитология и генетика.*1988, Т.22,№7 С.67-72.
7. Пирс Э. Гистохимия. М.: ИЛ. 1963. 944 с.